

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002 年1 月10 日 (10.01.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/01952 A1

- (51) 国際特許分類: A01N 1/02 (74) 代理人: 矢野正行(YANO, Masayuki); 〒612-8450 京都府京都市伏見区竹田烏羽殿町9番地 メモワールビル Kyoto (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/05509
- (22) 国際出願日: 2001 年6 月27 日 (27.06.2001) (81) 指定国 (国内): AU, CA, CN, JP, KR, US.
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (26) 国際公開の言語: 日本語 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- (30) 優先権データ:  
特願2000-203891 2000 年7 月5 日 (05.07.2000) JP
- (71) 出願人 および  
(72) 発明者: 和田洋巳 (WADA, Hiromi) [JP/JP]; 〒520-0865 滋賀県大津市南郷二丁目32-16 Shiga (JP). 大仲憲治 (OHNAKA, Kenji) [JP/JP]; 〒605-0074 京都府京都市東山区祇園町南側570番地8 Kyoto (JP).
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PRESERVATION FLUID FOR CELLS AND TISSUES

(54) 発明の名称: 細胞・組織保存液

(57) Abstract: A preservation fluid for cells and tissues, containing a polyphenol as the active ingredient. The fluid may further contain trehalose. The preferable osmotic pressure range is 270 to 450 Osm/l and the preferable pH range is 7 to 8. The preservation fluid is superior to those of the prior art in protective action and can maintain the structures and functions of cells and tissues for a prolonged period.

(57) 要約:

ポリフェノールを有効成分とする細胞・組織保存液である。また、トレハロースを含有していても良い。浸透圧の好ましい範囲は270～450 Osm/l であり、pHの好ましい範囲は7～8である。従来の細胞・組織保存液よりも保護作用に優れていて、構造及び機能を長期間維持することができる。

WO 02/01952 A1

## 明細書

## 細胞・組織保存液

## 技術分野

本発明は、細胞を保存し、また臓器、肢体、皮膚その他の組織を保存するための液体に属する。

## 背景技術

臓器を移植する場合、臓器提供者から摘出した移植臓器を手術時まで保存する。また、不慮の事故により切断された指、腕等の肢体を吻合する場合、肢体を手術時まで保存する。このように、生化学の分野あるいは医学の分野においては、細胞、及び臓器・肢体・皮膚等の組織を保存するケースがある。細胞及び組織を保存する際には、その構造及び機能が損なわれないように、細胞・組織保存液に浸漬させた状態で保存する。従来の細胞・組織保存液としては、例えばユーローコリンズ液（Euro-Collins液）やUW液（University of Wisconsin液）がある。

ユーローコリンズ液は、塩化カリウム、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム、炭酸水素ナトリウム及びブドウ糖を含有する溶液である。この保存液は、機能維持力の高い腎臓には利用できるものの、肺等の臓器については保護作用が十分ではなく、また機能維持期間が短い。一方、UW液は、不浸透剤としてラクトビオン酸ナトリウムとラフィノース、膠質浸透圧剤としてヒドロキシエチル澱粉を含有し、さらにアデノシンやインスリンを含有する溶液である。この保存液では、保護作用が増し、機能維持期間も長くなるが、製剤学的に不安定である。

これらの他に、従来の保存液として、特開平6-40801号に開示

された保存液（以下、E T - K y o t o 液）がある。この保存液では、ユーローコリンズ液よりも細胞及び組織に対する保護作用が優れていて、機能維持期間も長く、しかも製剤学的に安定している。

本発明の課題は、従来の保存液よりも保護作用に優れていて、構造及び機能を長期間維持することができる細胞・組織保存液を提供することにある。

#### 発明の開示

本発明者らは、鋭意検討した結果、ポリフェノールを有効成分とする本発明の細胞・組織保存液を完成することができた。ポリフェノールは抗酸化作用をもつため、本発明の保存液は細胞及び組織に対して高い保護作用を備える。よって、本発明の保存液によると、細胞及び組織の構造及び機能を長期間維持することが可能である。

本発明の保存液において、ポリフェノールとしては、ガテキン、エピカテキン、ガロカテキン、エピガロカテキン、ルチン、クロロゲン、ケルセチン、アントシアニン、フラボノイドなどがある。これらの化合物は、お茶、そば、コーヒー、タマネギ、むらさき芋などの植物より抽出され得る。また、これらの化合物は化学合成されても良い。好ましいポリフェノールの濃度は、0.01 mM ~ 2000 mM、更に好ましくは0.1 mM ~ 200 mM、特に好ましくは0.1 mM ~ 10 mMである。

細胞及び組織に対する保護作用をさらに高めるために、本発明の保存液にトレハロースを含有させても良い。トレハロースには、 $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース、 $\alpha$ ,  $\beta$ -トレハロース及び $\beta$ ,  $\beta$ -トレハロースの3種が存在するが、いずれを用いても良い。好ましくは天然に存在する $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースを用いる。好ましいトレハロースの濃度は、50 mM ~ 240 mMである。

本発明の保存液では、細胞及び組織が保存中に膨張又は収縮するのを防ぐために、浸透圧が270～450 Osm/lの範囲にあると好ましい。また、細胞の酸性分解を防止するためには、pHが7～8の範囲にあるのが望ましい。本発明の保存液の浸透圧及びpHをこれらの範囲にするには、適当な浸透圧剤や電解質を加えると良い。

浸透圧剤としては、ヒドロキシエチル澱粉、デキストラン澱粉等の膠質浸透圧剤がある。ヒドロキシエチル澱粉は、置換度が0.4～0.8の範囲のもので、平均分子量200000～900000のものが好ましく、さらに好ましくは平均分子量350000～800000のものである。電解質としては、有機酸のナトリウム塩若しくはカリウム塩、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウム、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素二カリウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸水素カリウム、炭酸ナトリウム及び炭酸カリウムを例示することができる。また有機酸としては、グルコン酸、乳酸、酢酸、プロピオン酸、β-ヒドロキシ酪酸及びクエン酸がある。

本発明の保存液の好ましい組成は次の通りである。

ポリフェノール	0.01～2000mM
トレハロース	50～240mM
Na <sup>+</sup>	10～140mM
K <sup>+</sup>	4～140mM
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> 又はHPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	12～65mM
Cl <sup>-</sup> 、HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 、CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> 、有機酸又は有機酸アニオン	15～150mM
ヒドロキシエチル澱粉	1～80g/l

本発明の保存液のより好ましい組成は次の通りである。

ポリフェノール	10～ 200mM
トレハロース	100～ 210mM
Na <sup>+</sup>	20～ 120mM
K <sup>+</sup>	20～ 130mM
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> 又はHPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	20～ 60mM
Cl <sup>-</sup> 、HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 、CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> 、有機酸又は有機酸アニオン	20～ 120mM
ヒドロキシエチル澱粉	20～ 40g/l

これら以外にも、例えばMg<sup>++</sup>及びCa<sup>++</sup>を1～1.0mMずつ含有させても良い。さらに、他の添加物、例えばATP等の細胞賦活剤、プロスタグランジン等の血管拡張剤、抗生物質を加えることができる。但し、製剤学的に安定させるため、インスリンのような不安定な化合物は添加されないのが望ましい。また、本発明の保存液の使用方法については、特に限定はないが、例えば、細胞又は組織を本発明の保存液に浸漬して、そのまま低温保存又は凍結保存すると良い。

#### 発明を実施するための最良の形態

##### －実施例1－

約50℃の蒸留水800mlに、お茶から抽出されたカテキン1g (3.45mmol)、α、α-トレハロース41g (120mmol)、ヒドロキシエチル澱粉(平均分子量429000、置換度0.5)30g、グルコン酸ナトリウム21.81g (100mmol)、リン酸二水素カリウム0.085g (6.5mmol)、及びリン酸水素二カリウム3.222g (18.5mmol)を溶解した後、蒸留水を加えて全量を1000mlとした。これを直ちに濾過し、ガラス瓶に入

れて密栓した後、蒸気滅菌することにより、浸透圧  $370 \text{ mOsm/l}$ 、 $\text{pH } 7.40$  の保存液を得た。

#### － 試験例 1 －

実施例 1 で得た保存液（実施例 1 液）の臓器保護作用について、下記のラット肺体外灌流モデルにより調べた。また、比較として、カテキンを添加しない以外は実施例 1 と同じように調製された保存液（E T - K y o t o 液）、及びユーローコリンズ液についても、同様に調べた。本試験は、30 匹の雄性ルイスラット（体重  $300 \text{ g} \sim 350 \text{ g}$ ）を無作為に 10 匹ずつ 3 群（I 群、II 群、III 群）に分けて行われ、保存液として I 群には E T - K y o t o 液を、II 群には実施例 1 液を、III 群にはユーローコリンズ液をそれぞれ使用した。

まず、3 ml のエンフルラン（大日本製薬株式会社販売、商品名：エトレン（登録商標））が入った集気瓶にラットを入れて、ラットに吸入麻酔をかけ、その後、ネンプタール 1 ml を腹腔内に注入した。そして、気管を切開してカニユーレを挿入し、ベンチレーターと接続して換気した。開腹及び開胸の後、ヘパリン 0.3 ml を腹腔大静脈に注入した。次に、別のカニユーレを右心室から肺動脈に穿刺挿入して、エアーを抜きながら内套を除去し、さらに三方活栓を介してカニユーレにチューブを接続してエアーを抜いた。下大静脈及び大動脈を切断し、左心耳及び右心室を切開した。その後、保存液 1 ml（プロスタグランジン E<sub>1</sub> を  $5 \mu\text{g}$  含む）をチューブよりゆっくりフラッシュした。さらに、保存液 50 ml（プロスタグランジン E<sub>1</sub> を  $5 \mu\text{g}$  含む）を 20 cm の落差を利用してフラッシュした。続いて、気管及び右心室に挿入した各カニユーレを牽引しながら心肺ブロックを摘出した。そして、摘出された心肺ブロックを保存液が入ったシャーレに浸漬し、 $4^\circ\text{C}$  で保存した。

15時間保存後、心肺ブロックから右肺を除去し、残った心左肺を灌流回路に接続した。灌流回路は、温度37℃、湿度100%の箱内に設置されており、またこの回路にはラットの新鮮な心肺ブロックも接続させている。灌流液としては、3匹のラット(ヘパリン1000U/匹投与)から得られた新鮮な混合静脈血30mlを用い、灌流速度4ml/分の条件下で60分間灌流した。灌流中、15時間保存後の心左肺については、100%の酸素ガスによって、一回換気量3ml、換気回数60回/分の条件下で換気し、一方、新鮮な心肺ブロックについては、4%の酸素、8%の二酸化炭素及び88%の窒素からなる混合ガスによって、一回換気量3ml、換気回数60回/分の条件下で換気した。これにより灌流液の酸素濃度及び二酸化炭素濃度をほぼ一定とした。また、肺水腫による浸出液がチューブから漏れる場合には、灌流を中止した。

灌流開始後10分経過時、60分経過時における心左肺のシャント率、平均肺動脈圧及び最高気道内圧を調べた。さらに、60分間灌流後あるいは灌流中止後の心左肺の湿乾重量比を求め、これから肺水腫の発生の程度を調べた。表1に結果を示す。

表1

	I 群 (n = 10)	II 群 (n = 10)	III 群 (n = 10)
シャント率 (%)	10分 21.5 ± 6.1	7.8 ± 0.9	66.5 ± 5.0
	60分 46.2 ± 3.2	10.8 ± 1.9	73.5 ± 8.1
平均肺動脈圧 (mmHg)	10分 24.5 ± 3.1	11.8 ± 0.9	31.5 ± 5.7
	60分 27.2 ± 2.3	12.8 ± 2.1	43.7 ± 6.5
最高気道内圧 (mmHg)	10分 13.5 ± 3.1	9.8 ± 0.9	21.6 ± 2.7
	60分 20.2 ± 2.5	10.8 ± 1.9	38.5 ± 3.2

湿乾重量比	9.5±1.1	5.8±0.9	15.5±2.5
-------	---------	---------	----------

表1に見られるように、いずれの項目についても、II群、I群、III群の順に有意に低かった。即ち、保存液の臓器保護作用は、実施例1液、ET-Kyoto液、ユーローコリンズ液の順に高かった。この結果は、ポリフェノールであるカテキンが実施例1液には含まれているのに対してET-Kyoto液及びユーローコリンズ液には含まれていないことから、ポリフェノールが高い臓器保護作用を有するということを示す。また、トレハロースが実施例1液及びET-Kyoto液には含まれているのに対してユーローコリンズ液には含まれていないことから、トレハロースも臓器保護作用を有するということを示す。以上より、ポリフェノールを含有する保存液は高い臓器保護作用を備え、ポリフェノール及びトレハロースを含有する保存液はより高い臓器保護作用を備えることが明らかとなった。

#### －実施例2－

Cellvation™（フナコシ株式会社製）という市販の細胞凍結保存液（Cellvation液）30mlに、お茶から抽出されたカテキン0.2g（0.69mmol）を溶解した後、Cellvation液を加えて全量を50.0mlとした。これにより、ポリフェノールを含む凍結用保存液を得た。

#### －試験例2－

実施例2で得た保存液（実施例2液）の凍結保存における細胞保護作用について、下記のようにして調べた。また、比較として、Cellvation液の細胞保護作用についても、同様に調べた。



まず、M D C K（大日本製薬株式会社製、原A T T C株番号C C L - 3 4、生存率9 5 %）という市販のセルタイプの犬腎臓細胞を用意し、これを6 0 0 ~ 8 0 0 r p mで1 0分間遠心した。続いて、上清を取り出し、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  cells/mlとなるように上清に保存液を加えて静かに懸濁した。この懸濁液を1 0個のプラスチック製バイアルに1 . 5 m l ずつ分注し、各バイアルを封じて2 5分間室温で放置した。その後、各バイアルを断熱容器に入れ、 $-70^{\circ}\text{C}$ のフリーザーに2時間放置した。次に、各バイアルを液体窒素の蒸気相に移して2 4時間放置した後、液体窒素の液相に移し、このまま凍結保存した。3 0日後、各バイアルを取り出し、 $37^{\circ}\text{C}$ の水浴中で速やかに融解した。融解後に、各バイアルを7 0 %のエタノールで拭いて、7 0分間室温で放置した。そして、各バイアル内の細胞を計数し、細胞生存率を求めた。

その結果、Cellvation液で凍結保存した細胞の生存率が平均8 3 %であるのに対して、実施例2液で凍結保存した細胞の生存率は平均9 0 %となり、実施例2液における生存率の方が有意に高かった。これにより、ポリフェノールを含有する保存液は高い細胞保護作用を備えるということが判った。

### －実施例3－

臓器の虚血再灌流に伴う酸化ストレスに対するポリフェノールの保護効果を、肺胞上皮細胞を用いた細胞培養モデルで検討した。実験方法及び結果を以下の細胞培養実験1－3に示す。

#### 細胞培養実験1

(1・1) この実験は、肺胞上皮細胞から酸化ストレスにより産生されるIL-8に対する緑茶

ポリフェノールの抑制効果を検討するものである。

(1・2) 使用した細胞：肺胞上皮細胞A549株

(1・3) 緑茶ポリフェノール（ファーマフーズ株式会社製）組成

		重量比 (%)
Catechin	C15H1406	3.2
Epicatechin	C15H1406	7.7
Gallocatechin	C15H1407	5.5
Epigallocatechin	C15H1407	7.2
Catechin gallate	C22H18010	3.4
Epicatechin gallate	C22H18010	11.6
Gallocatechin gallate	C22H18011	12.9
Epigallocatechin gallate	C22H18011	26.9

(1・4) 方法

A549細胞を $1 \times 10^5$  cells/mlの濃度で24-well dishで培養し、16時間後、緑茶ポリフェノール含有培地（緑茶ポリフェノール濃度：0-0.4mM）に培地交換し2時間培養を行った。その後 $H_2O_2$ （最終濃度400  $\mu$ M）及び炎症性サイトカインTNF- $\alpha$ （最終濃度20nM）にて刺激し、1, 3, 6時間後に培地を採取し、ELISA法（ELISA吸光度測定器：NJ-2001 microplate reader、Human IL-8 ELISA kit：Pharmlngen、OptEIA Human IL-8 Set）を用いて培地中IL-8濃度を測定した。

(1・5) 結果

$H_2O_2$  およびTNF- $\alpha$  刺激によってA549細胞から産生されるIL-8は増大し、この産生増大は緑茶ポリフェノールによって用量依存的に抑制された（表2及び表3）。これらの結果より、緑茶ポリフェノールは酸化ストレスに伴う肺胞上皮細胞からのIL-8産生を抑制することが明らかになった。

表2

TNF- $\alpha$  刺激群 : (mean  $\pm$  SD、n=9、\*p<0.05 vs 0mg/ml group)

ポリフェノール濃度	刺激後培養時間		
	1時間	3時間	6時間
0mM (0mg/ml)	188.0 $\pm$ 85.7	2532.3 $\pm$ 393.6	4211.5 $\pm$ 564.5
0.1mM (0.05mg/ml)	*154.2 $\pm$ 44.4	*1689.4 $\pm$ 148.5	*2602.6 $\pm$ 484.1
0.2mM (0.1mg/ml)	*124.5 $\pm$ 57.7	*1209.3 $\pm$ 386.3	*1739.1 $\pm$ 704.8
0.4mM (0.2mg/ml)	*39.8 $\pm$ 26.5	*314.0 $\pm$ 243.8	*655.0 $\pm$ 468.7

表3

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激群 : (mean  $\pm$  SD、n=9、\*p<0.05 vs 0mg/ml group)

ポリフェノール濃度	刺激後培養時間		
	1時間	3時間	6時間
0mM (0mg/ml)	89.6 $\pm$ 6.0	318.4 $\pm$ 35.8	1102.1 $\pm$ 70.6
0.1mM (0.05mg/ml)	61.1 $\pm$ 25.8	*241.6 $\pm$ 3.6	*716.4 $\pm$ 80.6
0.2mM (0.1mg/ml)	*45.8 $\pm$ 16.4	*203.8 $\pm$ 42.9	*546.9 $\pm$ 25.4
0.4mM (0.2mg/ml)	*33.6 $\pm$ 2.9	*79.4 $\pm$ 48.4	*263.4 $\pm$ 168.9

## 細胞培養実験2

(2・1) この実験は、IL-8産生の制御に重要な役割を果たしている2つのmitogen activated protein kinase (MAPK)、すなわちjun N-terminal kinase (JNK) 及びp38の活性化 (リン酸化) に対する緑茶ポリフェノールの効果を検討するものである。

(2・2) 使用した細胞 : 細胞培養実験1と同じ

(2・3) 緑茶ポリフェノール組成 : 細胞培養実験1と同じ

(2・4) 方法

A549細胞を $1 \times 10^5$  cells/mlの濃度で60mm dishで培養し、24時間後、緑茶ポリフェノール含有培地 (緑茶ポリフェノール濃度 : 0.4mM) に培地交換して2時間培養。その後、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (最終濃

度400  $\mu$ M)にて刺激し、30分後 (p38 MAPK) および60分後 (JNK)にWestern blottingによるタンパクの定量を行い、p38とJNKの活性化 (リン酸化) の程度を検討した。なお、予備実験では $H_2O_2$ による刺激の後、p38 MAPKは30分後、JNKは60分後に最も強く活性化することを確認した。

#### (2・5) 結果

JNK, p38 MAPK は緑茶ポリフェノールによって表4に示すように活性化が抑制された。

表 4

緑茶ポリフェノール濃度	JNK	p38
0mM (0mg/ml)	100	100
0.1mM (0.05 (mg/ml)	50.6 $\pm$ 3.7	55.8 $\pm$ 7.6
0.2mM (0.1mg/ml)	48.1 $\pm$ 3.5	39.5 $\pm$ 11.7
0.4mM (0.2mg/ml)	37.4 $\pm$ 4.2	30.5 $\pm$ 7.8

これらの結果から、緑茶ポリフェノールによるIL-8産生抑制には、p38およびJNKのリン酸化抑制が関与していると考えられた。

#### 細胞培養実験3

(3・1) この実験は、緑茶ポリフェノールの肺胞上皮細胞に対する安全性を確認するものである。

(3・2) 使用した細胞：細胞培養実験1と同じ

(3・3) 緑茶ポリフェノール組成：細胞培養実験1と同じ

(3・4) 方法

A549細胞を $5 \times 10^4$  cells/wellの濃度で96-well dishで培養し、24時間後、緑茶ポリフェノール含有培地 (緑茶ポリフェノール濃度：0-0.4mM) に培地交換して8時間培養を行った。その後、トリパンブルー染色を行い、総細胞数と生存細胞数を計測し、細胞生存率を計算した。

(3・5) 結果

表 5 に示すように緑茶ポリフェノールは、0-0.4mMの濃度でA549細胞の生存率に影響を与えなかった。この結果より、緑茶ポリフェノールの肺胞上皮細胞に対する安全性が確認された。

表 5

Polyphenol (mM)	細胞生存率 (%)
0	99.6 ± 0.4
0.1	99.4 ± 0.2
0.2	99.5 ± 0.1
0.4	99.5 ± 0.2

但し、細胞生存率 (%) = (生存細胞数/総細胞数) × 100%

#### 産業上の利用可能性

本発明の保存液は、細胞及び臓器・肢体・皮膚等の組織に対して高い保護作用を示す。よって、本発明の保存液によると、細胞及び組織の構造及び機能を長期間維持することが可能である。

## 請求の範囲

1. ポリフェノールを有効成分とする細胞・組織保存液。
2. ポリフェノールの濃度が 0.01 ~ 2000 mM の範囲にある請求項 1 に記載の細胞・組織保存液。
3. ポリフェノールがカテキンである請求項 1 又は 2 に記載の細胞・組織保存液。
4. トレハロースを含有する請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の細胞・組織保存液。
5. トレハロースの濃度が 50 ~ 240 mM の範囲にある請求項 4 に記載の細胞・組織保存液。
6. トレハロースが  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースである請求項 4 又は 5 に記載の細胞・組織保存液。
7. ヒドロキシエチル澱粉を含有する請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の細胞・組織保存液。
8. 浸透圧が 270 ~ 450 Osm/l の範囲にある請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の細胞・組織保存液。
9. pH が 7 ~ 8 の範囲にある請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の細胞・組織保存液。
10. 次の組成からなる細胞・組織保存液。

ポリフェノール	0.01 ~ 2000mM
トレハロース	50 ~ 240mM
Na <sup>+</sup>	10 ~ 140mM
K <sup>+</sup>	4 ~ 140mM
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> 又はHPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	12 ~ 65mM
Cl <sup>-</sup> 、HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 、CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> 、有機酸又は有機酸アニオン	15 ~ 150mM
ヒドロキシエチル澱粉	1 ~ 80g/l

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/05509

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int. Cl.<sup>7</sup> A01N1/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int. Cl.<sup>7</sup> A01N1/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CA (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 3-93782 A (Pacific Chem. Ind. Co.), 18 April, 1991 (18.04.91), Claims; working example & FR 2651132 A1	1-3 4-10
X Y	EP 845264 A1 (Emil Flachsmann AG), 03 June, 1998 (03.06.98), Claims & CA 2217227 A1	1-3 4-10
Y	EP 580444 A1 (Ajinomoto Co., Inc.), 26 January, 1994 (26.01.94), Claims & JP 6-40801 A Claims	4-10
P, X	EP 1057405 A1 (MG Pharmacy Ltd.), 06 December, 2000 (06.12.00), Claims & JP 2000-344602 A Claims	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.


* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"B" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
03 September, 2001 (03.09.01)Date of mailing of the international search report  
11 September, 2001 (11.09.01)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> A01N1/02		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> A01N1/02		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
CA (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP 3-93782 A(太平洋化学株式会社), 18. 4月. 1991(18. 04. 91), 特許 請求の範囲, 実施例 & FR 2651132 A1	1-3 4-10
X Y	EP 845264 A1(Emil Flachsmann AG), 3. 6月. 1998(03. 06. 98), Claims & CA 2217227 A1	1-3 4-10
Y	EP 580444 A1(AJINOMOTO CO., INC.), 26. 1月. 1994(26. 01. 94), Claims & JP 6-40801 A, 特許請求の範囲	4-10
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	03. 09. 01	国際調査報告の発送日
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JPO) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 松本 直子 電話番号 03-3581-1101 内線 3443
		4H 9546 



C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	EP 1057405 A1 (MG Pharmacy Ltd.), 6. 12月. 2000 (06. 12. 00), Claims & JP 2000-344602 A, 特許請求の範囲	1-10